

アフリカツメガエル四肢再生過程における基部先端部軸形成に関わる分子機構

著者	大湖 史朗
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第170号
URL	http://hdl.handle.net/10097/51193

おおご しろう _____

氏名（本籍地） 大湖 史朗

学位の種類 博士（生命科学）

学位記番号 生博第170号

学位授与年月日 平成22年3月25日

学位授与の要件 学位規程第4条第1項該当

研究科，専攻 東北大学大学院生命科学研究科
（博士課程）生命機能科学専攻

論文題目 アフリカツメガエル四肢再生過程における基部先端部軸形成
に関わる分子機構

博士論文審査委員 （主査） 教授 田村 宏 治
教授 仲村 春 和
准教授 美濃川 拓 哉

論文内容の要旨

両生類はヒトなどの哺乳類とは異なり、器官レベルでの再生が可能である。この高い器官再生能をもつ両生類を対象に器官再生のメカニズムを理解することは、将来的にヒトの器官再生の実現へと繋がることが期待される。イモリなどの有尾両生類は生涯高い四肢再生能をもつが、無尾両生類であるアフリカツメガエルにおける四肢再生能は限定的である。アフリカツメガエルはオタマジャクシの時には肢芽を切断しても失った部分を完全に再生することができるが、変態が進むにつれ徐々にこの再生能は失われていき、変態直後の成体（froglet）では四肢切断後スパイクと呼ばれる分岐・分節といったパターンをもたない一本の棒状軟骨が形成される。四肢再生はいくつかの過程に分けることができ、その中でパターン形成に着目するとアフリカツメガエルの froglet で形成されるスパイクは、切断部位に関係なく肩から指先にかけて基部先端部軸に沿った分節構造が見られない。そのため froglet の四肢再生過程では、基部先端部軸のパターン形成が正常に行われていないことが推測される。本研究ではこの仮説を検証するために、基部先端部軸形成に働くメカニズムを詳細に調べた。

1. *hoxa11*, *hoxa13* を指標とした四肢再生過程における基部先端部軸形成

発生過程初期の肢芽において *hoxa13* は *hoxa11* の発現領域内で入れ子状の発現パターンを示す。その後発生が進むにつれ両者の発現領域は分離し、*hoxa11* は予定軀脚部領域で、*hoxa13* は予定自脚部領域で発現する。この発現パターンから、*hoxa11* と *hoxa13* は基部先端部軸形成のマーカー遺伝子として用いられている。正常なパターンをもった再生を行えるオタマジャクシの肢芽再生過程において *hoxa11* と *hoxa13* の発現を調べたところ、発生過程と同様の発現パターンが観察された。しかしながら、スパイクを形成する froglet の再生芽では *hoxa11* と *hoxa13* の重なり合った発現は見られたものの、再生が進んでも *hoxa11* と *hoxa13* の発現領域の分離は見られなかった。さらに肢芽の細胞や再生芽細胞は、基部先端部軸に沿って細胞の接着性に違いがあることが示されており、この接着性の差を生み出す候補遺伝子の一つとして考えられている *EphA4* が froglet の四肢再生過程では発現していないことを見出した。また Eph は *hoxa13* によって発現調節を受ける可能性が示

唆されている。そこで *hoxa13* の発現量の定量的な解析を行ったところ、成体の再生芽では幼生の再生芽に比べて *hoxa13* の発現量が低いことが明らかになった。この結果より *froglet* の再生過程では、*hoxa13* の発現量の低下と *EphA4* の発現が見られないこととの間に相関関係があることが考えられた。以上より、*froglet* の四肢再生過程では基部先端部軸に沿ったパターン形成が正常に行われていないことが分子レベルで示された。

2. 基部先端部軸形成におけるレチノイン酸シグナリングの影響

次に、基部先端部軸に沿ったパターン形成不全の原因を調べるために、マーカーとして用いた *hox* 遺伝子よりも上位で基部先端部軸形成に働くレチノイン酸シグナルに着目した。レチノイン酸シグナルは、四肢発生過程・再生過程において基部側化シグナルとして働いていると考えられている。四肢発生過程では、体幹部でレチノイン酸合成酵素である *Retinaldehyde dehydrogenase* (*Raldh*) が発現し、レチノイン酸を肢芽に供給している。その一方で、レチノイン酸分解酵素である *Cyp26* (cytochrome P450) が先端部で発現することで、基部先端部軸に沿ったレチノイン酸シグナルの活性勾配が形成される。そこで、アフリカツメガエルの四肢再生過程でこれらレチノイン酸関連遺伝子の発現パターンを調べたところ、オタマジャクシの初期再生芽では *Cyp26b1* の発現が見られ、逆に *Raldh2* の発現は見られなかった。その後、再生が進み組織分化が見られ始めた再生芽では、*Cyp26b1* の再生芽内での発現は減少し、再生芽内での *Raldh2* の発現が見られるようになった。その一方で *froglet* の再生過程では、再生芽内において、*Cyp26b1* および *Raldh2* の発現はほとんど見られなかった。これらの結果より、*froglet* の四肢再生過程ではレチノイン酸関連遺伝子が正常に発現しないため、レチノイン酸シグナルの活性状態が破綻している可能性が示唆された。その結果として、1. で示した *hoxa11*、*hoxa13* を中心とした基部先端部軸形成メカニズムが正常に行われないのかもしれない。

以上の研究より、これまで理解されていなかった *froglet* の四肢再生過程における基部先端部軸形成不全、その原因の一つと考えられる分子メカニズムを見出した。この原因と考えら

れる分子メカニズムを改善させることで、パターン形成不全の回復につながるかを検討することが今後の課題となるだろう。

論文審査結果の要旨

無尾両生類アフリカツメガエルの成体は切断された四肢を完全には再生できず、棒状軟骨を伴う不完全な再生体しか形成しない。しかも、切断部位によらず常に同様の棒状軟骨を形成することから、基部（肩）から先端部（指先）にかけての軸形成にかかる分子メカニズムのどこかに不全が生じている可能性が考えられる。しかし、基部先端部軸形成に重要な *Hoxa13* 遺伝子の発現は観察されており (Endo et al., 2000)、不全が生じるメカニズムは不明であった。本研究は、この形態形成不全が *Hoxa13* 遺伝子発現の欠落ではなく再発現後の発現変化の不整合と発現量の低下が原因となっている可能性を明瞭に示した。*Hoxa13* と *Hoxa11* はともにアフリカツメガエルの成体四肢再生過程で再発現してくるが、正常発生過程で見られるような基部先端部軸方向に沿った両者の発現分離が見られず、再発現したパターンがそのまま途中で止まった状態で再生が進んでしまうことを見出している。さらに *Hoxa13* は再発現しているもののその発現量が低いこと、*Hoxa13* 遺伝子の下流で機能すると考えられている Ephrin/Eph シグナリングにも不全があること、その Ephrin/Eph シグナルが関与する細胞表面特性を再生芽細胞が有していないこと、を次々と明らかにしていった。これらの結果から、*Hoxa13* 遺伝子の発現量の低下がひとつの原因となり、その下流に存在する分子および細胞メカニズムの不全が生じ、結果として基部先端部軸方向の形態形成が不完全な状態で再生が進み、そのまま軟骨形成を経て再生が完了することが、アフリカツメガエル成体四肢再生過程の形態形成不全の重要な側面を表しているというモデルを提唱している。

さらに本研究では、*Hoxa13* 遺伝子発現の低下の原因にも言及し、ホメオボックス転写因子の上位で機能するレチノイン酸シグナルに注目し、そのシグナリングのキー分子である *Raldh2*、*Cyp26b*、*Meis* の発現にも異常がみられることを見出している。また、レチノイン酸シグナルの強度を検出するためのトランスジェニックツメガエルの作出にも成功しており、新規概念を提唱しただけでなく、当該研究分野に対してさまざまな重要な貢献をもたらした。これらの研究成果は本人が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを明確に示しており、大湖 史朗提出の論文を、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。